

① BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ Offenlegungsschrift  
⑩ DE 196 38 004 A 1

⑤ Int. Cl.<sup>8</sup>:  
C 07 C 403/24  
C 09 B 61/00  
C 12 P 23/00  
// C 07M 9:00 (C12P  
23/00, C12R 1:645)

⑳ Aktenzeichen: 196 38 004.9  
㉔ Anmeldetag: 18. 9. 96  
㉕ Offenlegungstag: 19. 3. 98

DE 196 38 004 A 1

㉑ Anmelder:  
SKW Trostberg AG, 83308 Trostberg, DE

㉒ Erfinder:  
Kohlrausch, Utz, Dr., 83308 Trostberg, DE; Faust,  
Robert, 84539 Ampfing, DE; Huber, Georg, 83352  
Altenmarkt, DE; Cully, Jan, Dr., 84518 Garching, DE

㉓ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit  
in Betracht zu ziehende Druckschriften:

DE-PS 12 67 644  
DE 43 42 788 A1  
EP 06 70 308 A1  
WO 94 10 140 A1

Derwent Abstract, Ref. 95-222386/29 zu  
RU 1028064-C;  
Chemical Abstract, Vol. 122, 1995, Ref. 54195y;

㉔ Verfahren zur Gewinnung von Carotinextrakten mit einem weitgehend unveränderten all-trans-Isomerenanteil aus Naturstoffen

㉕ Zur Gewinnung von  $\beta$ -Carotinextrakten mit einem weitgehend unveränderten all-trans-Isomerenanteil werden Naturstoffe, wie z. B. fermentierte Biomasse, in mindestens zwei Schritten mit einem flüssigen organischen Lösemittel(-gemisch) aus der Reihe Ethylacetat, Butylacetat, Cyclohexan und Aceton bei Temperaturen zwischen 40°C und dem Siedepunkt des Lösemittels extrahiert, wobei die Gesamt-Temperaturbelastungszeit für das Ausgangsmaterial fünf Stunden nicht überschreitet. Mit diesem Verfahren werden im Gegensatz zu den entsprechenden einstufigen Extraktionsverfahren  $\beta$ -Carotinextrakte erhalten, die bzgl. ihres Verhältnisses von cis- zu all-trans-Isomeren weitgehend denen der Ausgangsmaterialien entsprechen und die darüber hinaus die von der Industrie geforderten Spezifikationen erfüllen.

DE 196 38 004 A 1

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von  $\beta$ -Carotinextrakten, das es mit Hilfe der Lösemitteltechnologie, durch die Wahl geeigneter Lösemittel(-gemische) sowie entsprechender Verfahrenstemperaturen in mehreren Extraktionsschritten ermöglicht, aus Naturstoffen  $\beta$ -Carotin mit weitgehend unveränderten Anteilen an all-trans-Isomeren zu extrahieren.

Carotinoidfarbstoffe sind in der Natur weitverbreitet und verleihen vielen Naturstoffen, wie z. B. Karotten, Paprikaschoten, Blüten (Tagetes) oder bestimmten Mikroorganismen, ihre charakteristische gelbe bis tiefrote Färbung. Die Klasse der Carotinoide wird in zwei Unterklassen aufgeteilt: Carotine, die chemisch gesehen reine Kohlenwasserstoffe sind, und Xantophylle, die oxygenierte Funktionen ( $-\text{OH}$ ,  $-\text{O}-$ ,  $=\text{O}$ ) im Molekül enthalten. Aufgrund ihrer Unterschiede in der chemischen Struktur zeigen Carotine und Xantophylle, die beide als natürliche Fettbegleitstoffe vorkommen, ein unterschiedliches Löseverhalten in organischen Lösemitteln.

Carotinverbindungen allgemein, insbesondere aber das  $\beta$ -Carotin, erlangten in der jüngsten Vergangenheit eine stetig zunehmende wirtschaftliche Bedeutung. Zum einen wird  $\beta$ -Carotin seit langem in der Lebensmitteltechnologie als färbender Zusatzstoff (Farbstoff) oder als Antioxidans eingesetzt, wobei das Anwendungsgebiet nicht auf lipide Systeme beschränkt ist, sondern durch den Einsatz besonderer Technologien, wie z. B. diverse Einkapselungen des  $\beta$ -Carotins, auch auf wäßrige Systeme ausgedehnt worden ist. Andererseits hat das  $\beta$ -Carotin in der Diätetik eine besondere Bedeutung erlangt, da ihm physiologisch die Funktion des Provitamins A zukommt. Insbesondere neuere Erkenntnisse, daß  $\beta$ -Carotin auch systemisch als Antioxidans und Radikalfänger wirken und darüberhinaus Beiträge in der Krebsprophylaxe liefern kann, führten dazu, daß es vermehrt in das Interesse einer größeren Verbrauchergruppe gerückt ist.

Der damit gestiegenen Nachfrage versucht die Industrie einerseits durch die Herstellung von synthetischem  $\beta$ -Carotin und andererseits durch die Extraktion und anschließende Kristallisation von  $\beta$ -Carotin aus natürlichen Quellen zu entsprechen. Dabei geben die Verbraucher entsprechend ihrem gegenwärtig kritischen Bewußtsein gegenüber synthetischen Produkten dem natürlichen  $\beta$ -Carotin eindeutig den Vorzug. Während noch vor relativ kurzer Zeit ausschließlich die "klassischen" natürlichen  $\beta$ -Carotinquellen, wie z. B. Karotten oder Algen, für wirtschaftliche Anreicherungsverfahren zur Verfügung standen, ist es in jüngster Zeit durch innovative Anstrengungen der Biotechnologie gelungen, sich mit fermentativen Methoden eine ungleich besser geeignete, natürliche Quelle zu erschließen.

Durch die Fermentation bestimmter sproßbildender Pilze kann heute eine Konzentration von bis zu über 5 Gew.-%  $\beta$ -Carotin in der getrockneten Fermentationsbiomasse erreicht werden. Insbesondere auch aufgrund dieser neuen biotechnologischen Entwicklungen besteht seitens der Industrie ein erhebliches Interesse an Extraktionsverfahren, die es ermöglichen, das natürliche  $\beta$ -Carotin aus der komplexen Naturstoffmatrix in wirtschaftlicher Weise zu extrahieren, wobei die gewonnenen Extrakte selbstverständlich dann qualitativ besonders hochstehend sind, wenn sie ein möglichst naturbelassenes Isomerenspektrum aufweisen.

Zur Extraktion des  $\beta$ -Carotins aus festen Naturstoffen sind bereits zahlreiche Verfahren bekannt. Wie bspw. in der US-Patentschrift 2 170 872 beschrieben, wird dazu häufig die Naturstoffmatrix mit Alkalilauge behandelt, um so einen Zellaufschluß und die Verseifung der Glyceride zu erzielen. Anschließend werden die aufgeschlossenen Zellen mit Petrolether, Heptan oder ähnlichen Lösemitteln extrahiert. Der Extrakt wird nach der Befreiung von Faserstoffen einer Wasserdampfdestillation unterzogen; anschließend wird der wäßrige Rückstand mit Pflanzenöl extrahiert, in dem das  $\beta$ -Carotin eine verhältnismäßig hohe Löslichkeit besitzt.

Gemäß einem Verfahren, das in der deutschen Offenlegungsschrift DE 43 42 798 beschrieben ist, können Carotinoide aus Algen direkt aus einer hochkonzentrierten Salzsolekultur mit großen Mengen an Speiseöl extrahiert werden, indem man den Stoffübergang durch eine Kolloidmühle begünstigt. Durch Rückführung des extraktbeladenen Öles kann der Wertstoff angereichert werden, der entweder das  $\beta$ -Carotin-haltige Öl sein kann, oder aber das  $\beta$ -Carotin muß erst noch aus dem Öl durch Kristallisation ausgefällt werden. Erfahrungsgemäß ist jedoch die Kristallisation des  $\beta$ -Carotins aus Öl unter Ausnutzung der temperaturbedingten Löslichkeitsunterschiede nicht unproblematisch, da die Kristallbildung nur sehr langsam erfolgt und das Öl auch bei niedrigen Temperaturen eine noch relativ hohe Restlöslichkeit für  $\beta$ -Carotin besitzt, so daß die Kristallisationsausbeuten nur gering sind.

Die Induktion der  $\beta$ -Carotin-Kristallisation durch die Zugabe von Lösemitteln dagegen führt zu grundsätzlich höheren Ausbeuten, jedoch ist die Zugabe von größeren Lösemittelmengen, wie z. B. in der Patentschrift US 1 988 031 für n-Propanol beschrieben, notwendig, um ein entsprechendes Ausbeuteergebnis zu erhalten. Bei der Extraktion aus Naturstoffen mit organischen Lösemitteln, wie z. B. Petrolether (vgl. die Patentschriften US 1 967,121 und 1 998 031) stellt sich generell das Problem, daß wegen der geringen Löslichkeit des  $\beta$ -Carotins und insbesondere im Fall hoher  $\beta$ -Carotin-Konzentrationen ein überaus großes Lösemittelverhältnis gewählt werden muß, das aber wiederum die Raum/Zeit-Ausbeute deutlich verschlechtert.

Vor kurzem wurden einige Verfahren beschrieben, bei denen die Extraktion des  $\beta$ -Carotins aus Naturstoffen mit überkritischem Kohlendioxid bei sehr hohen Verfahrensdrücken (US 4 400 398) durchgeführt wird. Trotz der guten Extraktionsergebnisse ist der allgemein gültige Nachteil dieses Gas-Extraktionsverfahrens in der aufwendigen technischen Umsetzung des benötigten Hochdruckes zu sehen, wobei diese Verfahren generell kostenintensiver sind als Verfahren, die unter Normaldruck arbeiten.

Als Alternativverfahren wurde deshalb unter Verweis auf die lebensmittelrechtliche Gesetzgebung und die damit verbundene Zulassung bestimmter Lösemittel für die Carotinoid-Farbstoffgewinnung in der DE 19531 254 vorgeschlagen, insbesondere das  $\beta$ -Carotin mit einem Lösemittelgemisch bestehend aus Ethylacetat und Butylacetat sowie einem Anteil von bis zu 25 Gew.-% eines Öls biologischen Ursprungs zu gewinnen. Das Extraktionsgemisch soll demzufolge bei 40 bis 125°C mehrere Stunden lang geführt werden, wodurch der natürliche Farbstoff in sehr großen Raum/Zeit-Ausbeuten und in guter Reinheit zu gewinnen ist.

Neben den mehrfach beschriebenen Nachteilen der Lösemittelverfahren allgemein besteht der größte Nachteil insbesondere bei all jenen Verfahren, die mit erhöhten Temperaturen versuchen, große Ausbeuten an  $\beta$ -Carotin zu erreichen, aber darin, daß sich durch Temperaturen  $> 40^\circ\text{C}$  das Isomerenspektrum des  $\beta$ -Carotins signifikant auf die Seite der cis-Isomeren verschiebt. Der entscheidende Vorteil der Carotinextrakte aus Naturstoffen gegenüber den synthetisch hergestellten Carotin, nämlich deren naturbelassener Charakter, wird somit durch den temperaturbedingten Rückgang der all-trans-Isomerenanteile bei der Lösemittelextraktion eingeschränkt. 5

Insbesondere können deshalb die für die verarbeitende Industrie wichtigen Spezifikationen nicht erreicht werden. Gemäß Spezifikation des Food Chemicals Codex werden nämlich Identitätskennzahlen vorausgesetzt, die in der sog. Kennzahl B indirekt den Höchstgehalt der cis-Isomerenanteile im  $\beta$ -Carotin vorschreiben. Diese Kennzahl B, deren Wert nicht kleiner als 15 sein soll, wird bislang von den synthetisch hergestellten  $\beta$ -Carotin 10 erfüllt.

Extraktionsverfahren, die bei Temperaturen  $< 40^\circ\text{C}$  arbeiten, sind auf der anderen Seite wegen der dann verminderten Löslichkeit des  $\beta$ -Carotins äußerst unwirtschaftlich, oder sie sind toxikologisch äußerst bedenklich, da sie als Lösemittel halogenierte Kohlenwasserstoffe verwenden. 15

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es deshalb, ein Verfahren zur Gewinnung von  $\beta$ -Carotinextrakten mit einem weitgehend unveränderten all-trans-Isomerenanteil durch Extraktion mit einem flüssigen organischen Lösemittel(-gemisch) aus Naturstoffen zur entwickeln, das trotz der Anwendung erhöhter Extraktionstemperaturen ein naturnahes Verhältnis von cis-Isomeren zu all-trans-Isomeren im  $\beta$ -Carotinextrakt ermöglicht, wobei sich dennoch unter Verwendung toxikologisch unbedenklicher Lösemittel die Gesamtextraktionsdauer und der verfahrenstechnische Aufwand im vertretbaren wirtschaftlichen Rahmen bewegen. 20

Gelöst wurde diese Aufgabe dadurch, daß das Ausgangsmaterial in mindestens zwei Schritten mit dem Lösemittel bei Temperaturen zwischen  $+40^\circ\text{C}$  und dem Siedepunkt des Lösemittels extrahiert wird und die Gesamt-Temperaturbelastungszeit für das Ausgangsmaterial die Extraktionszeit von 5 Stunden nicht überschreitet. 25

Überraschend hat sich dabei gezeigt, daß die cis-Isomerenbildung durch die Aufteilung des Extraktionsvorganges in mehrere Extraktionsschritte gezielt unterdrückt werden kann, wodurch die gewonnenen  $\beta$ -Carotinextrakte nicht nur die angestrebten naturbelassenen Isomerenverteilungen mit weitgehend unveränderten Anteilen an all-trans-Isomeren aufweisen, sondern daß darüberhinaus die aus den Extrakten gewonnenen kristallinen Carotine die insbesondere für die verarbeitende Industrie wichtigen Spezifikationen erreichen. Diese Vorteile des Verfahrens waren in dieser Deutlichkeit überhaupt nicht zu erwarten. 30

Somit ist beim vorliegenden Verfahren als erfindungswesentliches Merkmal insbesondere anzusehen, daß die Extraktion des Ausgangsmaterials in mindestens zwei Schritten durchgeführt wird.

Im Gegensatz zu den bekannten Lösemittelverfahren, die bislang alle mit nur einem einzigen Extraktionsschritt arbeiten, werden die  $\beta$ -Carotinextrakte nun erfindungsgemäß bevorzugt in drei bis fünf Extraktionsschritten aus den Naturstoffen gewonnen, wobei als Lösemittel eines aus der Gruppe Ethylacetat, Butylacetat, Cyclohexan und Aceton oder eine Mischung davon eingesetzt wird. 35

Das gesamte Ausgangsmaterial wird zu diesem Zweck nacheinander den der Anzahl der Extraktionsschritte entsprechenden Lösemittelportionen zugesetzt, die nicht unbedingt gleiche Volumina aufweisen müssen, und jeweils so lange extrahiert, daß die Summe der einzelnen Extraktionszeiten nicht die Dauer der entsprechenden Extraktion in nur einer Stufe überschreitet. 40

Zur Erzielung möglichst geringer cis-Isomerenanteile und um insbesondere das bei 340 nm stark absorbierende 13-cis- $\beta$ -Carotin zurückzudrängen, müssen die Extraktionstemperatur und die Gesamt-Temperaturbelastungszeit für das Extraktionsgut genau aufeinander abgestimmt werden. Da die genannten cis-Isomeren aus dem all-trans- $\beta$ -Carotin vorwiegend bei erhöhten Temperaturen entstehen, sollten die Extraktionsverfahren im allgemeinen bei möglichst tiefen Temperaturen durchgeführt werden, was allerdings aufgrund der geringen Löslichkeit des all-trans- $\beta$ -Carotins bei Temperaturen unter  $+40^\circ\text{C}$  sehr unwirtschaftlich ist. 45

Für die vorliegende Erfindung war es deshalb wichtig, die zeitliche Länge der einzelnen Extraktionsschritte so zu wählen, daß die Gesamt-Temperaturbelastungszeit für das zu extrahierende Ausgangsmaterial bei dennoch guten Raum/Zeit-Ausbeuten und optimalem Isomerenverhältnis möglichst kurz bleibt und vor allem die Extraktionszeit des vergleichbaren einstufigen Extraktionsverfahrens nicht überschreitet. 50

Das jeweils gewählte Lösemittel soll dabei immer den Anteil des im Ausgangsmaterial vorhandenen  $\beta$ -Carotins übersteigen und erfindungsgemäß im Gewichtsverhältnis von 50 bis 1000:1 eingesetzt werden.

Die Aufteilung der zur Extraktion benötigten Gesamtlösemittelmengen muß nicht unbedingt in gleich große Portionen erfolgen. So kann bspw. das Entstehen der unerwünschten 13-cis-Isomeren bei deutlich erhöhten Temperaturen, wie dies in der Nähe des Lösemittelsiedepunktes der Fall ist, deutlich unterdrückt werden, wenn die Gesamtmenge des Lösemittels bspw. im zweistufigen Verfahren im Verhältnis 3 : 2 auf die beiden Extraktionsschritte aufgeteilt wird. Auf diese Weise ist es möglich, mit einem Lösemittelverfahren bis nahe an den jeweiligen Siedepunkt des Lösemittels heranzuarbeiten, wodurch sehr hohe Raum/Zeit-Ausbeuten möglich werden. 55 60

In Abhängigkeit von der Güte des Ausgangsmaterials und dem zu erzielenden Isomerenspektrum hat es sich gemäß vorliegender Erfindung als vorteilhaft erwiesen, die einzelnen Extraktionsschritte bei unterschiedlichen Temperaturen durchzuführen, wobei für den jeweiligen Anwendungsfall zu entscheiden ist, ob die Extraktionsschritte bei ansteigenden, fallenden oder alternierend ansteigenden bzw. abfallenden Temperaturen im beanspruchten Bereich durchzuführen sind. Falls Temperaturschritte nötig sein sollten, wird man aber üblicherweise auf die Variante mit ansteigenden Temperaturen bspw. in drei Schritten bei 60, dann 70 und schließlich  $80^\circ\text{C}$  zurückgreifen. Von Vorteil kann es aber auch sein, die Länge der einzelnen Extraktionsschritte zu variieren, d. h. die zwei bis fünf Extraktionsschritte müssen bezogen auf die Dauer der jeweiligen Temperatureinwirkung nicht 65

unbedingt immer gleich lang sein.

Als besonders geeignet hat es sich gemäß Erfindung erwiesen, in speziellen Verfahrensvarianten das Ausgangsmaterial entweder bei 60°C mit einer Gesamt-Temperaturbelastungszeit von maximal 260 Minuten oder bei 70°C mit einer Gesamtbelastungszeit von maximal 80 Minuten zu extrahieren.

Die Effizienz des erfindungsgemäßen Verfahrens durch eine mehrfache kurzzeitige Extraktion wird gegenüber den einstufigen Verfahrensweisen zusätzlich dadurch gesteigert, daß physikalische Extraktionsbeschleunigungsgeräte bspw. vom Typ eines Ultraturrax eingesetzt werden. Im Idealfall kommt das erfindungsgemäße Verfahren durch zahlreiche einzelne Extraktionsschritte einem kontinuierlich in einer Extraktionskolonne mit mehreren Böden durchgeführten Verfahren sehr nahe, es ist allerdings sehr viel wirtschaftlicher durchzuführen.

Das vorliegende Gewinnungsverfahren für  $\beta$ -Carotin wird vorzugsweise für fermentierte Biomasse angewendet, die insbesondere aus *Blakeslea-trispora*-Mikroorganismen besteht. Selbstverständlich können aber auch alle anderen natürlichen Quellen für  $\beta$ -Carotin herangezogen werden, deren wirtschaftliche Aufarbeitung hohe  $\beta$ -Carotinausbeuten erwarten lassen.

Ein weiterer der zahlreichen Vorteile des Verfahrens gemäß Erfindung ist darin zu sehen, daß die Carotin-Verluste in der lipophilen Mutterlauge während des Kristallisationsvorganges minimiert sind, da das all-trans-Isomere in lipophilen Medien weit weniger gut löslich ist als cis-Isomere, weshalb beim Vorliegen minimaler 13-cis-Isomerenmengen in der Kristallisationslösung maximale  $\beta$ -Carotinkristallausbeuten zu erzielen sind.

Die Gewinnung des kristallinen  $\beta$ -Carotins aus den Extrakten kann in an sich bekannter Art und Weise erfolgen.

Die nachfolgenden Beispiele sollen die Vorteile des erfindungsgemäßen Extraktionsverfahrens verdeutlichen.

#### Beispiel 1

50 g einer durch Fermentation hergestellten, trockenen *Blakeslea trispora*-Biomasse wurden bei 70°C mit einer Gesamtmenge von 240 Gew.-Teilen Ethylacetat (bezogen auf die in der Biomasse vorhandene  $\beta$ -Carotinmenge) in einer Gesamtzeit von 20 Minuten vergleichend in einem, zwei bzw. vier Extraktionsschritten extrahiert. Als physikalisches Extraktionsbeschleunigungsgerät wurde ein Ultraturrax verwendet. Bei der mehrstufigen Verfahrensweise wurden die gewonnenen Einzelextrakte am Ende zu einem Gesamtextrakt vereinigt. All-trans- $\beta$ -Carotin sowie sein 13-cis-Isomeres wurde mittels HPLC im Ausgangsmaterial sowie im Gesamtextrakt (9-cis- $\beta$ -Carotin liegt unter der Nachweisgrenze) gemessen, der prozentuale Anteil des 13-cis- $\beta$ -Carotins am Gesamt- $\beta$ -Carotin rechnerisch ermittelt. Die Extraktionsausbeute lag in allen Fällen über 90% des im Ausgangsmaterial vorhandenen  $\beta$ -Carotins.

#### Ergebnisse

33

40

45

50

| Anzahl Extraktionsstufen | Teile Ethylacetat pro Extraktionsstufe bezogen auf $\beta$ -Carotin im Ausgangsmaterial | Extraktionszeit pro Extraktionsstufe in Minuten | Prozent 13-cis- $\beta$ -Carotin |
|--------------------------|---|---|----------------------------------|
| 1 (= Vergleich)          | 240   | 20  | 12,3                             |
| 2                        | 120   | 10  | 8,6                              |
| 4                        | 60  | 5   | 6,9                              |
| Ausgangsmaterial         |   |   | 6,3                              |

#### Beispiel 2

55

Ausgangsmaterial und Versuchsdurchführung entsprachen Beispiel 1. Anstelle von Ethylacetat wurde als Lösemittel Butylacetat eingesetzt. Die vergleichenden Extraktionen (ein-, zwei-, vierstufig) wurden jeweils bei 40, 70 sowie 90°C durchgeführt. Die Extraktionsausbeuten lagen in allen Fällen über 80%.

60

65

## Ergebnisse

| Anzahl Extraktionsstufen | Teile Butylacetat pro Extraktionsstufe bez. auf $\beta$ -Carotin im Ausgangsmaterial | Extraktionszeit pro Extraktionsstufe in Minuten | Prozent 13-cis- $\beta$ -Carotin |      |      |
|--------------------------|--|---|----------------------------------|------|------|
|                          |  |   | 40°C                             | 70°C | 90°C |
| 1 (= Vergleich)          | 240  | 20  | 7,0                              | 13,9 | 28,1 |
| 2                        | 120  | 10  | 6,5                              | 8,2  | 15,1 |
| 4                        | 60   | 5   | 6,6                              | 7,5  | 9,9  |
| Ausgangsmaterial         |  |   | 6,3                              |      |      |

## Beispiel 3

Ausgangsmaterial und Versuchsdurchführung entsprachen Beispiel 1. Als Lösemittel wurden reines Cyclohexan sowie reines Ethylacetat eingesetzt. Die Gesamtmenge Lösemittel betrug jeweils 1000 Gew.-Teile bezogen auf das im Ausgangsmaterial vorhandene  $\beta$ -Carotin. Die Gesamtextraktionszeit war 20 Minuten unter Verwendung eines Ultraturrax.  $\beta$ -Carotin wurde vergleichend in einem bzw. zwei Einzelschritten extrahiert. Die  $\beta$ -Carotinextraktionsausbeuten lagen in allen Fällen über 90% bezogen auf das im Ausgangsmaterial vorhandene  $\beta$ -Carotin.

## Ergebnisse

## Ethylacetat

| Anzahl Extraktionsstufen | Teile Ethylacetat pro Extraktionsstufe bez. auf $\beta$ -Carotin im Ausgangsmaterial | Extraktionszeit pro Extraktionsstufe in Minuten | Prozent 13-cis- $\beta$ -Carotin |
|--------------------------|--|---|----------------------------------|
| 1 (= Vergleich)          | 1 000  | 20  | 11,7                             |
| 2                        | 500  | 10  | 7,1                              |
| Ausgangsmaterial         |  |   | 6,3                              |

## Cyclohexan

| Anzahl Extraktionsstufen | Teile Cyclohexan pro Extraktionsstufe bez. auf $\beta$ -Carotin im Ausgangsmaterial | Extraktionszeit pro Extraktionsstufe in Minuten | Prozent 13-cis- $\beta$ -Carotin |
|--------------------------|---|---|----------------------------------|
| 1 (= Vergleich)          | 1 000   | 20  | 12,0                             |
| 2                        | 500   | 10  | 7,6                              |
| Ausgangsmaterial         |   |   | 6,3                              |

## Beispiel 4

Ausgangsmaterial wie in Beispiel 1 wurde bei 70° C mit einer Gesamtmenge von 240 Teilen reinem Cyclohexan extrahiert. Verglichen wurde jeweils die Extraktion in einem Schritt mit der Verteilung der insgesamt eingesetzten Lösemittelmenge auf zwei Extraktionsschritte (1. Schritt: 144 Teile; 2. Schritt: 96 Teile; = Verhältnis 3 : 2). Die Extraktionszeit betrug beim einstufigen Verfahren 20 Minuten mit Ultraturrax zuzüglich 40 Minuten Rühren des Extraktionsansatzes ohne Ultraturrax; bei zweistufiger Verfahrensweise wurde für jede Stufe 10 Minuten mit dem Ultraturrax extrahiert zuzüglich 20 Minuten Rühren des Ansatzes bei Extraktionstemperatur. Somit war die Gesamt-Temperaturbelastungszeit des Ausgangsmaterials jeweils gleich. Die Analytik entsprach der im Beispiel 1.

## Ergebnisse

| Anzahl Extraktionsstufen | Teile Cyclohexan pro Extraktionsstufe bez. auf $\beta$ -Carotin im Ausgangsmaterial | Extraktionszeit pro Extraktionsstufe in Minuten | Prozent 13-cis- $\beta$ -Carotin |
|--------------------------|---|---|----------------------------------|
| 1 (= Vergleich)          | 240   | 60  | 19,5                             |
| 2                        | 144 + 96  | 30  | 10,9                             |
| Ausgangsmaterial         |   |   | 6,3                              |

## Beispiel 5

Ausführung und Analytik wie in Beispiel 4. Die Extraktionstemperatur betrug 40° C.

## Ergebnisse

| Anzahl Extraktionsstufen | Teile Cyclohexan pro Extraktionsstufe bez. auf $\beta$ -Carotin im Ausgangsmaterial | Extraktionszeit pro Extraktionsstufe in Minuten | Prozent 13-cis- $\beta$ -Carotin |
|--------------------------|---|---|----------------------------------|
| 1 (= Vergleich)          | 240   | 60  | 7,3                              |
| 2                        | 144 + 96  | 30  | 6,7                              |
| Ausgangsmaterial         |   |   | 6,3                              |

## Beispiel 6

Ausführung und Analytik wie in Beispiel 4. Das Extraktionslösemittel war eine Mischung aus gleichen Gewichtsteilen Cyclohexan und Ethylacetat. Die Extraktionsausbeuten waren in allen Fällen > 90% bezogen auf das im Ausgangsmaterial vorhandene  $\beta$ -Carotin.

| Anzahl Extraktionsstufen | Teile Cyclohexan/<br>Ethylacetat pro<br>Extraktionsstufe bez.<br>auf $\beta$ -Carotin im<br>Ausgangsmaterial | Extraktionszeit pro<br>Extraktionsstufe in<br>Minuten | Prozent<br>13-cis- $\beta$ -Carotin |
|--------------------------|--|---|-------------------------------------|
| 1 (= Vergleich)          | 240  | 60  | 15,7                                |
| 2                        | 144 + 96   | 30  | 9,5                                 |
| Ausgangsmaterial         |  |   | 6,3                                 |

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Gewinnung von  $\beta$ -Carotinextrakten mit einem weitgehend unveränderten all-trans-Isomerenanteil durch Extraktion mit einem flüssigen organischen Lösemittel(-gemisch) aus Naturstoffen, dadurch gekennzeichnet, daß das Ausgangsmaterial in mindestens zwei Schritten mit dem Lösemittel bei Temperaturen zwischen  $+40^{\circ}\text{C}$  und dem Siedepunkt des Lösemittels extrahiert wird und die Gesamt-Temperaturbelastungszeit für das Ausgangsmaterial die Extraktionszeit von fünf Stunden nicht überschreitet.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Lösemittel eines aus der Gruppe Ethylacetat, Butylacetat, Cyclohexan und Aceton oder eine Mischung davon eingesetzt wird.
3. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Lösemittel im Gewichtsverhältnis von 50 bis 1000 : 1 bezogen auf das im Ausgangsmaterial vorhandene  $\beta$ -Carotin eingesetzt wird.
4. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Gewinnung in drei bis fünf Extraktionsschritten durchgeführt wird.
5. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Extraktionsschritte bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt werden.
6. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Ausgangsmaterial bei  $60^{\circ}\text{C}$  mit einer Gesamt-Temperaturbelastungszeit von maximal 260 Minuten extrahiert wird.
7. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Ausgangsmaterial bei  $70^{\circ}\text{C}$  mit einer Gesamt-Temperaturbelastungszeit von maximal 80 Minuten extrahiert wird.
8. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß als Ausgangsmaterial fermentierte Biomasse, insbesondere Biomasse bestehend aus *Blakeslea trispora*-Mikroorganismen, eingesetzt wird.

- Leerseite -